

**PCT**ORGANISATION MONDIALE D  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

|   |    |  |
|---|----|--|
| (51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :<br>A61K 38/17 | A1 | (11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/04006</b><br>(43) Date de publication internationale: 15 février 1996 (15.02.96) |
|---|----|--|

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01030

(22) Date de dépôt international: 31 juillet 1995 (31.07.95)

(30) Données relatives à la priorité:  
94/09527 1er août 1994 (01.08.94) FR(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT  
FRANÇAIS DE RECHERCHES SCIENTIFIQUES POUR  
LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION- ORSTOM  
[FR/FR]; 213, rue La Fayette, F-75010 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): STEFAS, Elie [FR/FR];  
94, allée des Fauvettes, F-34280 La Grande-Motte (FR).  
RUCHETON, Marcel [FR/FR]; 10, rue de la Confrérie, F-  
34000 Montpellier (FR). GRAAFLAND, Hubert [FR/FR];  
10 A, avenue du Professeur-Grasset, F-34000 Montpellier  
(FR). VEAS, Francisco [FR/FR]; 601, avenue du Père-  
Soulas, F-34000 Montpellier (FR).(74) Mandataire: PEUSCET, Jacques; Cabinet Peuscet et autres,  
68, rue d'Hauteville, F-75010 Paris (FR).(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: USE OF AT LEAST ONE FORM OF THE  $\beta$ 2-GLYCOPROTEIN I AS AN ANTI-INFECTIOUS AGENT AND PHARMA-  
CEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAME(54) Titre: UTILISATION DE LA  $\beta$ 2-GLYCOPROTEINE I SOUS AU MOINS UNE DE SES FORMES COMME AGENT ANTI-  
INFECTIEUX ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE CORRESPONDANTE

(57) Abstract

Use of the  $\beta$ 2-glycoprotein I, in at least one of its forms, for producing an anti-infectious agent for treating infectious diseases and capable of in vitro and in vivo activity. Used in vivo, it provides an anti-infectious drug for the medical treatment of animals or humans.

(57) Abrégé

Utilisation de la  $\beta$ 2-glycoprotéine I sous au moins une des ses formes pour l'obtention d'un agent anti-infectieux destiné au traitement des maladies infectieuses et susceptible d'être mis en œuvre in vitro et in vivo. L'utilisation in vivo fournit un médicament anti-infectieux pour usage en médecine humaine ou vétérinaire.

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche                  | GB | Royaume-Uni                                | MR | Mauritanie            |
| AU | Australie                 | GE | Géorgie                                    | MW | Malawi                |
| BB | Barbade                   | GN | Guinée                                     | NE | Niger                 |
| BE | Belgique                  | GR | Grèce                                      | NL | Pays-Bas              |
| BF | Burkina Faso              | HU | Hongrie                                    | NO | Norvège               |
| BG | Bulgarie                  | IE | Irlande                                    | NZ | Nouvelle-Zélande      |
| BJ | Bénin                     | IT | Italie                                     | PL | Pologne               |
| BR | Brazil                    | JP | Japon                                      | PT | Portugal              |
| BY | Bélarus                   | KE | Kenya                                      | RO | Roumanie              |
| CA | Canada                    | KG | Kirghizistan                               | RU | Fédération de Russie  |
| CF | République centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan                |
| CG | Congo                     | KR | République de Corée                        | SE | Suède                 |
| CH | Suisse                    | KZ | Kazakhstan                                 | SI | Slovénie              |
| CI | Côte d'Ivoire             | LI | Liechtenstein                              | SK | Slovaquie             |
| CM | Cameroon                  | LK | Sri Lanka                                  | SN | Sénégal               |
| CN | Chine                     | LU | Luxembourg                                 | TD | Tchad                 |
| CS | Tchécoslovaquie           | LV | Lettonie                                   | TG | Togo                  |
| CZ | République tchèque        | MC | Monaco                                     | TJ | Tadjikistan           |
| DE | Allemagne                 | MD | République de Moldova                      | TT | Trinité-et-Tobago     |
| DK | Danemark                  | MG | Madagascar                                 | UA | Ukraine               |
| ES | Espagne                   | ML | Mali                                       | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FI | Finlande                  | MN | Montolie                                   | UZ | Ouzbékistan           |
| FR | France                    |    |  | VN | Viet Nam              |
| GA | Gabon                     |    |  |    |                       |

UTILISATION DE LA  $\beta$ 2-GLYCOPROTEINE I SOUS AU MOINS  
UNE DE SES FORMES COMME AGENT ANTI-INFECTIEUX ET  
COMPOSITION PHARMACEUTIQUE CORRESPONDANTE.

L'invention concerne l'utilisation d'une protéine  
5 plasmatique comme agent anti-infectieux et une composition  
pharmaceutique injectable contenant ladite protéine.

On sait que la  $\beta$ 2-glycoprotéine I, ci-après en abrégé  
" $\beta$ 2GPI", est une glycoprotéine plasmatique, dont la séquence a été  
notamment indiquée dans les articles de J. LOZIER et coll. Proc. Natl.  
10 Acad. Sci. ISA, Vol. 81, pages 3640-3644, Juillet 1984 et de T.  
KRISTENSEN et coll., FEBS Letters, Vol. 289, 1991, pages 183-186.  
La  $\beta$ 2GPI est également appelée Apolipoprotéine H. Il a été constaté  
que cette protéine présente un polymorphisme : la dénomination  
 $\beta$ 2GPI sera ci-après considérée comme générique pour toutes les  
15 formes.

Dans la demande internationale WO 94/18569, on a  
indiqué que certains composés viraux se fixaient de façon spécifique  
sur une forme de  $\beta$ 2GPI, à savoir celle décrite dans la demande de  
brevet français 2 701 263, que cette forme de  $\beta$ 2GPI soit à l'état pur ou  
20 dans une composition protéinique la contenant ; cette forme de  $\beta$ 2GPI  
est isolée à partir du résidu fixé sur la (les) colonne(s) de  
chromatographie d'affinité utilisée(s) dans le procédé de purification de  
l'albumine du plasma sanguin décrit dans FR-A-2 690 444 ; elle a un  
poids moléculaire de  $50\,000 \pm 3\,000$  daltons ; dans le cadre de la  
25 présente demande de brevet, cette forme de  $\beta$ 2GPI a été désignée en  
abrégé par " $\beta$ 2'GPI". On a donc proposé dans WO 94/18569 un  
procédé de détection et/ou de dosage de composés viraux, dans lequel  
on fixe les composés viraux (CIV) à l'aide de  $\beta$ 2'GPI. Dans un tel  
procédé, on ajoute donc la  $\beta$ 2'GPI sur des CIV contenus dans un  
30 matériau biologique, de façon à séparer les CIV ainsi capturés pour  
ensuite les détecter et/ou les doser.

Selon la présente invention, on a maintenant trouvé que, de  
façon inattendue, la  $\beta$ 2-glycoprotéine I a un effet anti-infectieux in vivo  
et in vitro sur les agents infectieux. Un objet de l'invention est donc  
35 l'utilisation de la  $\beta$ 2GPI pour la préparation de médicaments destinés à

combattre les agents infectieux. Les applications du procédé selon l'invention sont avantageuses en médecine humaine ou vétérinaire.

De façon générale, pour la mise en oeuvre du procédé, selon l'invention, la  $\beta$ 2GPI peut être d'origine animale ou, peut être  
5 produite par voie génétique et/ou synthétique. La  $\beta$ 2GPI peut être utilisée sous la forme de  $\beta$ 2'GPI définie ci-dessus. Elle peut être mise en oeuvre sous forme d'une composition protéinique, de préférence la composition protéinique aqueuse obtenue par élution d'une colonne de chromatographie d'affinité dans le procédé de purification de  
10 l'albumine humaine décrit dans FR-A-2 690 444. Elle peut être utilisée purifiée ou en mélange; elle peut être utilisée indépendamment et/ou successivement avec au moins un composé injectable et/ou biologique.

Par agent infectieux, on entend ici, de façon générale, un composé infectieux, notamment d'origine biologique ou produit par  
15 voie génétique et/ou synthétique, susceptible de provoquer des désordres in vivo et/ou in vitro, notamment des maladies infectieuses. Les composés infectieux sont désignés ci-après, en abrégé, par "CI".

Ces CI, notamment pour l'effet in vivo, sont aussi bien des composés, en particulier protéiniques, constitutifs d'un agent  
20 infectieux, que des structures qui comprennent des composés infectieux. Ces structures sont, notamment, ou bien des agents infectieux endogènes ou exogènes, complets ou incomplets, leurs métabolites ou encore des assemblages contenant des composés constitutifs de ces agents infectieux, assemblages qui présentent  
25 certaines propriétés desdits agents infectieux, notamment la propriété d'être détectés par certains anticorps spécifiques de composés infectieux. Les CI peuvent être aussi des composés spécifiquement induits dans l'organisme par les CI précédemment définis, ou par l'expression de gènes s'exprimant de façon anormale. Par exemple un  
30 acide nucléique synthétique peut transfecter une cellule animale et est donc est un CI.

On a, notamment, constaté que l'on pouvait utiliser la  $\beta$ 2GPI pour le traitement d'une maladie infectieuse incluse dans le groupe formé par l'hépatite B, l'herpes simplex, la déficience  
35 immunitaire générée par HIV1, HIV2 ou SIV, la leishmaniose, le

paludisme, la toxoplasmose, l'amibiose, la candidose, l'aspergillose, les borellioses, les leucémies et les myélomes.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique contenant, dans un support pharmaceutiquement acceptable, au moins un agent anti-infectieux caractérisé par le fait qu'elle contient, comme agent anti-infectieux, une quantité active de  $\beta$ 2GPI sous au moins une de ses formes.

Dans le cas du traitement des mammifères, en particulier l'homme, une dose totale de 8 à 80 mg de protéine active par kg de sujet traité est convenable dans un traitement par injection. Cependant, des doses supérieures peuvent être utilisées dans la mesure où on n'observe pas d'effet indésirable.

Les exemples donnés ci-après montrent l'effet anti-infectieux de la  $\beta$ 2GPI. Dans certains, on a suivi in vivo l'infection de souris BALB/C par *Leishmania Mexicana Amazonensis*, ci-après désigné par LMA, parasite humain infectant les macrophages (Mc ELRATH M.J., KAPLAN G., MUSVAT A. and COHN, Z.A. Cutaneous Leishmaniasis. The defect in T. cell influx in BALB/c mice. J. Exp. Med (1987) 165 p. 546).

#### 20 Préparation de la $\beta$ 2' GPI

On utilise, comme matière première de départ, un plasma humain fractionné selon le procédé décrit par KISTLER ET NITSCHMAN (Vox Sang. 7, 414-424 (1962)), qui est une méthode dérivée de celle de COHN.

On part du surnageant IV, qui comprend 40 % (en volume) d'éthanol et qui a un pH de  $5,85 \pm 0,05$ , on dilue de moitié le surnageant avec une solution de NaCl à 7 g/l. Le pH est ajusté à  $7,45 \pm 0,05$  avec une solution de soude 1N. On préconcentre l'albumine jusqu'à 90 g/l dans une cassette d'ultrafiltration de type "Oméga" (Filtron) mise en oeuvre dans un système d'ultrafiltration "Miniset SS Cell NPT Cell" (Filtron Techn. Corp.). Cette cassette a une surface filtrante de 0,07 m<sup>2</sup> et un seuil de rétention de 30 KDa. La circulation est assurée par une pompe péristaltique à une pression qui varie de  $2 \times 10^5$  Pa au début de l'opération à  $5 \times 10^5$  Pa vers la fin. Lorsque l'on a atteint la concentration de 90 g/l en albumine, on ajoute à la solution d'albumine une solution de NaCl à 9 g/l et on continue à dialyser à volume constant jusqu'à obtenir un taux d'éthanol inférieur à

0,1 % en volume. Lorsque l'éthanol a été ainsi éliminé, on poursuit la dialyse en concentrant la solution jusqu'à 200 g d'albumine par litre. On ajuste le pH à  $7,10 \pm 0,05$  avec une solution d'acide chlorhydrique 1N.

5 La solution d'albumine ainsi préparée à partir du surnageant IV est alors filtrée stérilement (filtre "Millex-GS" de 0,2 micron (Millipore)).

La solution aqueuse brute d'albumine obtenue subit d'abord une chromatographie d'affinité. Cette chromatographie est  
10 réalisée dans une colonne de 50 ml (2,5 cm x 10 cm) (Biorad), chargée avec un matériau particulaire vendu par la société "SIGMA" sous la dénomination commerciale "DEXTRAN BEADS SULFATED". La colonne est préalablement équilibrée en faisant passer dans le lit 3 volumes de  
15 colonne de sérum physiologique. La solution d'albumine est alors envoyée sur cette colonne.

Le déroulement de la chromatographie est suivi en mesurant la densité optique à 280 nm des fractions en sortie de colonne. Le débit de la colonne est de 16 cm/heure ; la chromatographie est effectuée entre 20 et 25° C.

20 Après passage de la solution d'albumine, la colonne d'affinité est lavée avec un tampon constitué de phosphates mono- et disodique à 0,01 mole/l, et de chlorure de sodium à 0,15 mole/l ayant un pH de  $7,00 \pm 0,05$  jusqu'à ce que la densité optique de l'effluent soit inférieure à 0,1. Les protéines fixées sur la colonne d'affinité sont  
25 alors éluées, en augmentant la force ionique, par passage d'une solution 2 M de NaCl. Le lavage et l'élution sont effectués à température ambiante, les débits de lavage et d'élution étant de 16 cm/h.

On a effectué, sur la solution obtenue, une électrophorèse dénaturante SDS-Page. On a obtenu une composition aqueuse contenant  
30 55 % en poids de  $\beta 2'$ GPI par rapport aux protéines totales.

La  $\beta 2'$ GPI est ensuite séparée et purifiée de la façon suivante : la composition protéinique obtenue par élution de la colonne de chromatographie d'affinité à l'aide d'une solution saline de NaCl à 2 moles/litre, est diluée 10 fois dans un tampon constitué de phosphates  
35 mono- et disodique, notamment à 0,01 mole/litre, dans des proportions donnant un pH de  $6,8 \pm 0,05$ . Elle subit alors une chromatographie sur gel phosphaté. Cette chromatographie est réalisée dans une colonne de

50 ml (2,5 cm x 10 cm) (Biorad), chargée avec un matériau particulaire  
vendu par la société "BIO-RAD" sous la dénomination commerciale  
"BIO-GEL HTP". La colonne est préalablement équilibrée en faisant  
passer dans le lit 3 volumes de colonne de tampon constitué de  
5 phosphates mono- et disodique, notamment à 0,01 mole/litre, dans des  
proportions donnant un pH de  $6,8 \pm 0,05$ . L'éluat protéinique de la  
précédente chromatographie, dilué, est alors envoyé sur cette colonne.  
La chromatographie est effectuée avec un débit d'environ 15 cm/heure  
à une température de 20° C. L'effluent est éliminé et le support  
10 chromatographique subit ensuite un lavage effectué à l'aide d'un  
tampon phosphaté, identique à celui ayant servi à équilibrer la colonne.  
Le lavage est maintenu tant que la densité optique de l'effluent est  
supérieure à une valeur prédéterminée, par exemple 0,1 UDO (unité de  
densité optique).

15 La  $\beta 2'$ GPI, qui se fixe sur le gel phosphaté, est alors éluee  
en augmentant la force ionique, notamment au moyen d'une solution de  
KCl ayant une concentration voisine de 1M. Cette solution d'élution est  
constituée de phosphates mono- et disodique, notamment à 0,01  
mole/litre, dans des proportions donnant un pH de  $6,8 \pm 0,05$  et de  
20 KCl 1 mole/litre. Le déroulement de la chromatographie est suivi en  
mesurant la densité optique à 280 nm des fractions en sortie de  
colonne. Le débit d'équilibrage de la colonne, de charge, de lavage et  
d'élution est de 16 cm/h. La chromatographie est effectuée à 20° C.

L'éluat est récupéré, puis dialysé, de préférence dans de  
25 l'eau injectable. La  $\beta 2'$ -glycoprotéine I isolée est alors lyophilisée et  
conservée à -25°C. Au moment de l'emploi, la dose voulue est dissoute  
dans du sérum physiologique (NaCl 0,15 M).

On peut suggérer diverses explications sur l'origine  
de l'effet anti-infectieux inattendu de la  $\beta 2'$ GPI, étant entendu que ces  
30 hypothèses ne peuvent, en aucun cas, être considérées comme  
susceptibles de limiter l'invention.

On peut, en premier lieu, penser à une reconnaissance du  
non-soi. Celle-ci pourrait être confirmée par le lien de la  $\beta 2'$ GPI avec  
des composés viraux qui est décrit dans la demande de brevet français  
35 93/01 400. La liaison entre  $\beta 2'$ GPI et l'antigène de surface de HBV a  
été confirmée (HAIDER MEHDI, M. J. KAPLAN, F.Y. ANLAR, X.

YANG, R. BAYER, K. SUTHERLAND and M. E. PEEPLES, Hepatitis B Virus Surface Antigen Binds to Apolipoprotein H. J. of Virol (1994) 68, p. 2415-2424).

On a testé, par ailleurs, la fixation de la  $\beta 2'$ GPI sur un certain nombre d'agents pathogènes fixés sur lame par acétone à froid. Dans  
5 chaque cas, la lame subit un lavage au tampon PBS, après quoi on met la préparation en contact avec une  $\beta 2'$ GPI marquée par un composé fluorescent. Ce contact est maintenu pendant 30 mn à température ambiante et il est effectué avec des compositions aqueuses contenant  
10 respectivement 2  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$  et 100  $\mu\text{g/ml}$  de protéine. On effectue ensuite deux lavages de 5 mn chacun au tampon PBS et on observe au microscope à ultra-violets les lames ainsi obtenues. On constate que des résultats positifs sont obtenus avec les agents infectieux suivants :

15 4 protozoaires : *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, tous trois positifs jusqu'à la concentration de 20  $\mu\text{g/ml}$  ; *Leishmania infantum* positif jusqu'à la concentration de 2  $\mu\text{g/ml}$ .

2 ouches de champignons : *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus*  
20 positifs jusqu'à la concentration de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Cette expérience montre le lien de la  $\beta 2'$ GPI avec des structures du non-soi autres que les virus et permet de considérer que l'activité anti-infectieuse observée ci-après avec les *Leishmanies* s'étend à d'autres agents pathogènes tels que ceux cités ci-dessus.

25 Dans une demande internationale PCT déposée le même jour que la présente demande par le même déposant en revendiquant les priorités françaises n° 94-09528 et 94-09529 du 1/08/94, on a montré l'influence des détergents et de la cardiolipine sur la fixation de la  $\beta 2'$ GPI à des protéines de HIV1 et HIV2, de la toxine anatétanique, et  
30 d'autres protéines de bactéries ou de mycoplasme.

De plus, on a observé que différents détergents ou phospholipides usuels modulent différemment la fixation de  $\beta 2'$ GPI, couplée à la phosphatase alcaline, notamment sur les protéines de HIV1 ou HIV2. Par exemple : la p26 de HIV recombinant (TRANSGENE)  
35 est fortement reconnue en présence de cardiolipine, du détergent commercialisé sous le nom "Tween 80", et faiblement en présence de



détergent commercialisé sous le nom "Triton X100". Les résultats obtenus indiquent le rôle primordial de ces composés, et notamment des phospholipides. Ainsi il peut y avoir des cas pathologiques où la  $\beta$ 2GPI existe chez le malade mais où l'injection d'une substance, qui se  
5 fixe sur  $\beta$ 2GPI, par exemple de la cardiolipine ou du dextran sulfate, provoquerait l'effet anti-infectieux, en la stimulant, de la  $\beta$ 2GPI.

On peut, en second lieu, penser que la  $\beta$ 2GPI intervient dans la défense de l'organisme, sa concentration plasmatique pouvant être diminuée lors de l'infection, notamment au cours des hépatites  
10 virales (MOZER et autres, Eur. J. of Pediatrics (1978), 128, p. 123-128). Mais aussi il est connu maintenant que les enfants qui meurent de malaria ont un taux très faible de  $\beta$ 2GPI (JAKOBSEN et autres, Infection and Immunity, octobre 1994, p. 4374 - 4379).

Par ailleurs, elle présente une homologie de  
15 séquence avec la "virokine", dite aussi "protéine majeure sécrétoire" du virus de la vaccine (KOTWAL et autres, Nature (1988) 335, p. 176-178). Plusieurs articles ont montré que certaines protéines virales étaient des facteurs de virulence car elles ont un effet de blocage des défenses non spécifiques de l'organisme. Ainsi, la glycoprotéine C1 du  
20 virus de l'Herpes Simplex (HSV) fonctionne comme un récepteur du C3b sur les cellules infectées par le virus et inhibe la lyse par le complément (HARRIS et autres, J. Infect. Dis. (1990) 162, p. 331-337). De même, le virus de Epstein-Barr (EBV) fonctionne comme un récepteur du 3ème composant du complément (MOLD et autres, J.  
25 Exp. Med. (1988), 168, p. 949-969). Herpès Virus Saimiri code pour une protéine dénommée CCPH (Complement Control Protein Homolog) qui montre une homologie de séquences significative avec des protéines de régulation connues pour interagir avec le C3b et le C4b ; ce virus code aussi pour une autre protéine qui montre 48 %  
30 d'homologie avec une protéine régulatrice de l'action du C9 (Hu CD 59) (ROTHER et autres, J. of Virol. (1994), 68, p. 730-737). La virokine est connue pour être un composant important pour la virulence in vivo (CHANG et autres, Microbiol. Pathogenesis (1992), 13, p. 49-59). Son action est, au moins partiellement, expliquée par les  
35 homologies de séquences (38 %) avec la première moitié du gène de la C4BP et par sa liaison avec C3b et C4b qui provoque, in vitro,

l'inhibition de l'action du complément (Mc KENZIE et autres, J. of Infect. Dis. (1992), 166, p. 1245-1250). L'homologie de séquence entre la virokinine et la  $\beta$ 2GPI pourrait aussi expliquer cette virulence si cette dernière a un rôle dans la défense de l'organisme.

5 En troisième lieu, l'effet anti-infectieux pourrait être dû à son affinité pour les lipides phosphorylés. En effet, dans la Malaria, les phospholipides libérés par le Plasmodium auraient une action toxique hypoglycémisante et seraient capables d'induire la libération par les macrophages de "tumor necrosis factor" (TNF). La  $\beta$ 2'-glycoprotéine I  
10 est susceptible de lier ces phospholipides, inhibant leur nocivité (TAYLOR et autres, Clin. Exp. Immunol. (1992), 90, p. 1-5).

En quatrième lieu, l'effet anti-infectieux pourrait tenir à l'interaction de la  $\beta$ 2GPI sur l'Héparane sulfate. En effet, l'augmentation de production d'Héparane sulfate dans les tissus en état  
15 d'inflammation chronique peut provoquer la production par les macrophages de prostaglandine E<sub>2</sub> (PG E<sub>2</sub>) ou d'autres substances susceptibles de freiner la réaction immunitaire (IHRCKE et autres, Immunol. Today (1993), 14, p. 500-505) ; or, il a été décrit que la  $\beta$ 2-glycoprotéine I est susceptible de se lier à l'Héparane sulfate (PLZE, et  
20 autres, Int. J. of Biochem (1979), 11, p. 265-270). Une inhibition de l'action de l'Héparane sulfate par la  $\beta$ 2GPI est donc possible et pourrait rendre compte de l'action anti-infectieuse de cette protéine.

En cinquième lieu, l'effet anti-infectieux pourrait tenir à l'interaction de la  $\beta$ 2GPI sur le lysozyme. En effet, la Société  
25 déposante a observé une interaction entre la  $\beta$ 2GPI couplée à la phosphatase alcaline et, d'une part, le lysozyme dans une technique de Western-blot, (avec 50 mM de tampon acétate/acide acétique, pH  $5,8 \pm 0,1$  et 0,5 % de "Triton X100") et, d'autre part, les granulations et le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles et/ou de  
30 leurs précurseurs (myélocytes et métamyélocytes) présents dans des prélèvements de moelle osseuse humaine, ou du sang de diverses espèces animales (souris, lapins), et ce en utilisant la technique décrite pour la mise en évidence de l'interaction entre la  $\beta$ 2GPI couplée à la phosphatase alcaline et les parasites. L'observation d'une liaison entre  
35 agents pathogènes  $\beta$ 2GPI et lysozyme peut correspondre à un phénomène de "focalisation" de l'activité protéolytique lysozymale sur

les agents pathogènes, par l'intermédiaire de la  $\beta 2$ GPI, et donc la destruction de ces derniers.

### EXEMPLE I

#### Protocole expérimental

5 On injecte par voie sous-cutanée dans les coussinets des pattes de souris BALB/C une dose d'amastigotes de LMA obtenus par culture in vitro selon l'article de Mc ELRATH et coll. cité ci-dessus. La dose d'amastigotes est mélangée à 25  $\mu$ l de milieu de culture RPMI 1640. Le diamètre des pattes, qui augmente avec la progression de l'infection, est mesuré à différents temps, à l'aide d'un pied à coulisse.

10 On a observé 4 souris BALB/C femelles âgées de 5 semaines ayant un poids compris entre 10 et 25 g :

- une souris témoin (ST) n'est ni infectée ni traitée par la  $\beta 2$ 'GPI
- une souris contrôle (SD) non infectée reçoit dans la patte arrière droite 30  $\mu$ l d'une solution de  $\beta 2$ 'GPI dans le sérum physiologique à 1 mg/ml (soit 30  $\mu$ g),
- une souris (SL) reçoit dans chacune des deux pattes arrière 500 000 amastigotes de LMA,
- une souris (SDL) reçoit simultanément :
  - 20 - dans la patte arrière gauche (SDL/PG) 500 000 amastigotes de LMA et 30  $\mu$ l de sérum physiologique,
  - dans la patte arrière droite (SDL/PD) 500 000 amastigotes de LMA et 30  $\mu$ l d'une solution de  $\beta 2$ 'GPI à 1 mg/ml (soit 30  $\mu$ g).

#### Résultats

25 Les diamètres des pattes, mesurés en mm, sont donnés dans le tableau I ci-après. La figure 1 annexée montre l'évolution dans le temps du diamètre moyen des pattes arrière pour chacune des souris ST, SD et SL. L'évolution du diamètre de chaque patte arrière de la souris SDL est donnée pour la patte droite SDL/PD et pour la patte gauche SDL/PG.

30

TABLEAU I

| JPI                        | SDL/PD | SDL/PG | SL  | SD  | ST  |
|----------------------------|--------|--------|-----|-----|-----|
| 0                          | 2,1    | 2,3    | 2,2 | 2,3 | 2,2 |
| 17                         | 2      | 2,5    | 2,4 | 2,3 | 2,1 |
| 20                         | 2,3    | 2,7    | 2,6 | 2,3 | 2,2 |
| 23                         | 2,6    | 2,4    | 2,8 | 2,4 | 2,3 |
| 41                         | 4,9    | 3,5    | 4,3 | 2,3 | 2,2 |
| 54                         | 4,4    | 4,1    | 5,4 | 2,3 | 2,3 |
| 71                         | 4,5    | 4      | 7,1 | 2,4 | 2,3 |
| 86                         | 2,8    | 5      | 8,9 | 2,4 | 2,4 |
| JPI = jours post-infection |        |        |     |     |     |

5

Les résultats montrent :

- 1) qu'il n'y a pas de différence significative entre les diamètres des pattes des souris ST et SD, ce qui montre que la  $\beta 2'$ GPI seule ne provoque pas d'inflammation mesurable ;
- 10 2) une augmentation croissante du diamètre des pattes de la souris SL infectée et non traitée par la  $\beta 2'$ GPI, ce qui montre l'infectiosité de l'inoculum de LMA utilisé ;
- 3) une faible augmentation du diamètre de la patte droite de la souris SDL (SDL/PD), notamment après le 54ème jour ;
- 15 4) une augmentation du diamètre de la patte gauche de la souris SDL (SDL/PG) qui est nettement plus faible que dans le cas de la souris SL, ce qui montre que la  $\beta 2'$ GPI injectée uniquement dans la patte droite (SDL/PD) a diffusé et a agi à distance sur le foyer infectieux de la patte gauche (SDL/PG).
- 20 Pour confirmer la diffusion de la  $\beta 2'$ -glycoprotéine I, on a réalisé une injection intrapéritonéale de 500  $\mu$ g de  $\beta 2'$ GPI dans la souris SDL 71 jours après infection. Un phénomène de nécrose localisée

et bien délimitée de la patte droite (SDL/PD) a été observé après 4 jours, suivi d'une rétraction de la zone nécrosée après 6 jours. Au 11ème jour, le tissu cicatriciel sous-jacent était visible, le diamètre de la patte droite se réduisant (2,8 mm au 86ème jour). L'injection  
5 péritonéale de  $\beta 2'$ GPI a donc agi sur l'infection au niveau de la patte droite.

## EXEMPLE 2

### Protocole expérimental

Il est le même que dans l'exemple 1, sauf que :

10 a) l'infection a été effectuée par injection de 10 millions de promastigotes de LMA dans chaque patte arrière de 10 souris BALB/C mâles jeunes adultes ; 2 souris témoins n'étaient pas infectées.

b) la  $\beta 2'$ GPI était injectée par voie intrapéritonéale en concentrations variables dans un volume constant de 250  $\mu$ l de sérum  
15 physiologique.

- 1) 2 souris ont reçu 1 mg de  $\beta 2'$ GPI, chacune en deux injections intrapéritonéales, à 55 et 66 jours après infection par LMA,
- 2) 1 souris a reçu 0,5 mg de  $\beta 2'$ GPI en une injection intrapéritonéale à 55 jours,
- 20 3) 1 souris a reçu 0,1 mg de  $\beta 2'$ GPI en une injection intrapéritonéale à 55 jours,
- 4) 1 souris a reçu 0,5 mg de  $\beta 2'$ GPI en 7 injections quotidiennes intrapéritonéales à partir de 55 jours après l'infection par LMA,
- 5) 3 souris ont reçu 0,5 mg de  $\beta 2'$ GPI en 14 injections  
25 intrapéritonéales quotidiennes de 35  $\mu$ g à partir de 55 jours après l'infection,
- 6) pour un contrôle positif de l'infection, 2 souris infectées n'ont pas reçu de  $\beta 2'$ GPI,
- 7) pour un contrôle négatif, 2 souris non infectées n'ont pas reçu de  
30  $\beta 2'$ GPI.

L'augmentation du diamètre moyen des pattes à partir du jour de la première injection de  $\beta 2'$ GPI, soit 56 jours après l'infection par LMA, ainsi que les écarts-type, sont donnés dans le tableau II ci-après.

35 La figure 2 annexée montre les courbes correspondantes et les écarts-type correspondants. D désigne ci-après la dose de  $\beta 2'$ GPI

- utilisée. Cet essai ayant montré que l'on obtient des résultats identiques pour les injections de 0,5 mg en petites doses séquentielles pendant 7 ou 14 jours ou en dose unique, les résultats ont été reportés dans la même colonne du tableau II (D = 0,5 mg) ci-après. Par ailleurs, on
- 5 n'a observé aucun effet néfaste pour les doses les plus fortes (D = 1 mg) qui correspondent pourtant à environ 5 fois la quantité de B2GPI circulante chez une souris.

TABLEAU II

10

| JPI   | D=1 mg<br>n=2   | D=0,5 mg<br>n=5  | D=0,1 mg<br>n=1 | D=0<br>n=2       | Con-<br>trôles |
|---|-----------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|
| 56  | 0               | 0                | 0               | 0                | 0              |
| 66  | 0,09 $\pm$ 0,17 | 0,02 $\pm$ 0,05  | 0,75 $\pm$ 0,49 | 0,05 $\pm$ 0,10  | 0              |
| 78  | 0,08 $\pm$ 0,26 | 0,04 $\pm$ 0,09  | 1,10 $\pm$ 0,28 | 0,053 $\pm$ 0,19 | 0              |
| 84  | 0,09 $\pm$ 0,27 | 0,03 $\pm$ 0,10  | 1,85 $\pm$ 0,35 | 0,75 $\pm$ 0,26  | 0              |
| 91  | 0,13 $\pm$ 0,32 | 0,01 $\pm$ 0,013 | 2,15 $\pm$ 0,07 | 0,93 $\pm$ 0,05  | 0              |
| JPI = Jour post infection<br>D = dose de $\beta$ 2'-glycoprotéine I<br>n = nombre de souris |                 |                  |                 |                  |                |

Ce tableau montre :

- 1) une augmentation nettement plus faible du diamètre des pattes à 84 et 91 jours après l'infection entre les souris traitées par des doses de 1 mg et 0,5 mg et les souris non traitées ou traitées à dose faible (0,1 mg),
- 15 2) l'existence, dans cet exemple, d'une dose d'efficacité maximale de 0,5 mg par souris.

20

### EXEMPLE 3

#### 5 Infection de lymphocytes de donneur sain par le virus de l'immunodéficience humaine HIV-1 en présence de $\beta 2'$ GPI et/ou de cardioline (CL)

Des lymphocytes de sujet sain ont été isolés classiquement par gradient de densité et centrifugation à travers une solution commercialisée sous le nom de "Ficoll". Après lavage en milieu "RPMI", les cellules ont été suspendues à raison de  $2 \times 10^6$  par ml dans un milieu RPMI puis 50  $\mu$ l ont été distribués dans les puits d'une plaque de culture. 50  $\mu$ l de  $\beta 2'$ GPI, à différentes doses (50; 5; 0,5  $\mu$ g) ont été préincubés à 4°C, pendant 30 minutes, avec 100  $\mu$ l de milieu RPMI contenant 100 unités infectieuses (dites "TCID<sub>50</sub>") de HIV1 souche LAI. Le mélange a ensuite été ajouté aux cellules dans les puits de la plaque de culture, puis complété en RPMI à 200  $\mu$ l contenant 10 % de sérum foetal. Les cultures ont enfin été incubées à 37°C. Le surnageant de culture a été changé tous les 3 jours et la mesure de l'infectivité a été réalisée au 17ème jour de post-infection, par le dosage de l'enzyme transcriptase reverse (RT) selon le protocole décrit dans "Current protocols in Immunology", COLIGAN et autres, (NIH), vol.2, 12-5-8.

Pour l'étude de l'influence des phospholipides sur l'infection en présence de  $\beta 2'$ GPI, 20  $\mu$ g de cardioline (CL) ont été préincubés avec 0,5  $\mu$ g et avec 5  $\mu$ g de  $\beta 2'$ GPI avant de les ajouter au virus.

La figure 3 montre l'activité de la RT en coups par minute (cpm), correspondant à de la thymidine tritiée incorporée en acide nucléique, en fonction de la dose de  $\beta 2'$ GPI. La réponse des lymphocytes en absence de virus (contrôle négatif) est figurée par la ligne de base en pointillés. Les histogrammes non ombrés représentent l'activité RT pour les quantités indiquées de  $\beta 2'$ GPI. Les déviations standard sont figurées. Les histogrammes ombrés en noir correspondent à l'addition de CL. On a observé environ 50 % d'inhibition de l'activité RT témoignant de l'infection virale pour les doses de 5  $\mu$ g et 50  $\mu$ g de  $\beta 2'$ GPI par essai. A la dose de 0,5  $\mu$ g, il y a peu d'inhibition sans CL mais, il y a environ 80 % d'inhibition en présence de CL, donc pour un rapport pondéral CL/ $\beta 2'$ GPI de 40.

### REVENDEICATIONS

- 5           1 - Utilisation de la  $\beta$ 2GPI sous au moins une de ses formes pour l'obtention d'un agent anti-infectieux destiné au traitement des maladies infectieuses.
- 2 - Utilisation selon la revendication 1, caractérisée par le fait que la  $\beta$ 2GPI est utilisée comme agent anti-infectieux in vitro.
- 10           3 - Utilisation selon la revendication 1, caractérisée par le fait que la  $\beta$ 2GPI est utilisée pour l'obtention d'un médicament de médecine humaine ou vétérinaire.
- 4 - Utilisation selon la revendication 3 pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement d'une maladie infectieuse incluse dans le groupe formé par l'hépatite B, l'herpes simplex, la
- 15           déficience immunitaire générée par HIV1, HIV2 ou SIV, la leishmaniose, le paludisme, la toxoplasmose, l'amibiose, la candidose, l'aspergillose, les borellioses.
- 5 - Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée par le fait que l'on met en oeuvre une  $\beta$ 2GPI purifiée ou en
- 20           mélange, cette mise en oeuvre pouvant se faire indépendamment et/ou successivement avec au moins un autre composé injectable et/ou biologique.
- 6 - Utilisation selon la revendication 5, caractérisée par le fait que les composés sont choisis dans le groupe formé par les
- 25           détergents, les lipides et les phospholipides.
- 7 - Utilisation selon la revendication 4, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de la leishmaniose.
- 8 - Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée par le fait que l'on met en oeuvre la  $\beta$ 2GPI sous sa forme
- 30            $\beta$ 2'GPI.
- 9 - Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée par le fait que l'on met en oeuvre la  $\beta$ 2GPI sous forme d'une composition aqueuse.



10 - Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée par le fait que l'on utilise une  $\beta$ 2GPI extraite du plasma sanguin humain.

5 11 - Composition pharmaceutique contenant, dans un support pharmaceutiquement acceptable, au moins un agent anti-infectieux, caractérisée par le fait qu'elle contient, comme agent anti-infectieux, une quantité active de  $\beta$ 2GPI sous au moins une de ses formes.

10 12 - Composition selon la revendication 11, caractérisée par le fait qu'elle est constituée d'une composition aqueuse administrable par injection à une dose totale de 8 à 80 mg de  $\beta$ 2GPI par kg de sujet traité.

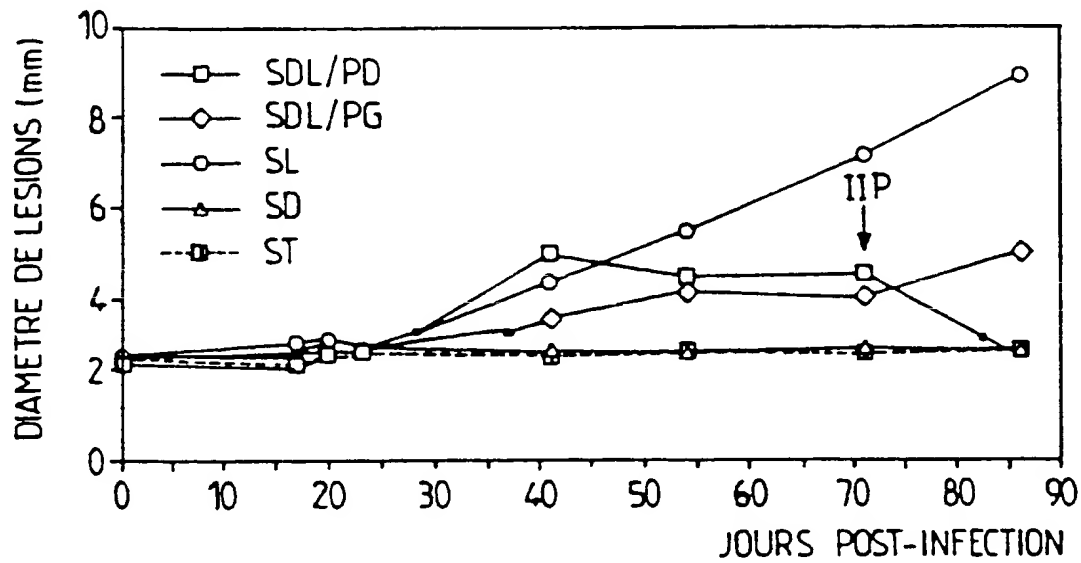


FIG.1

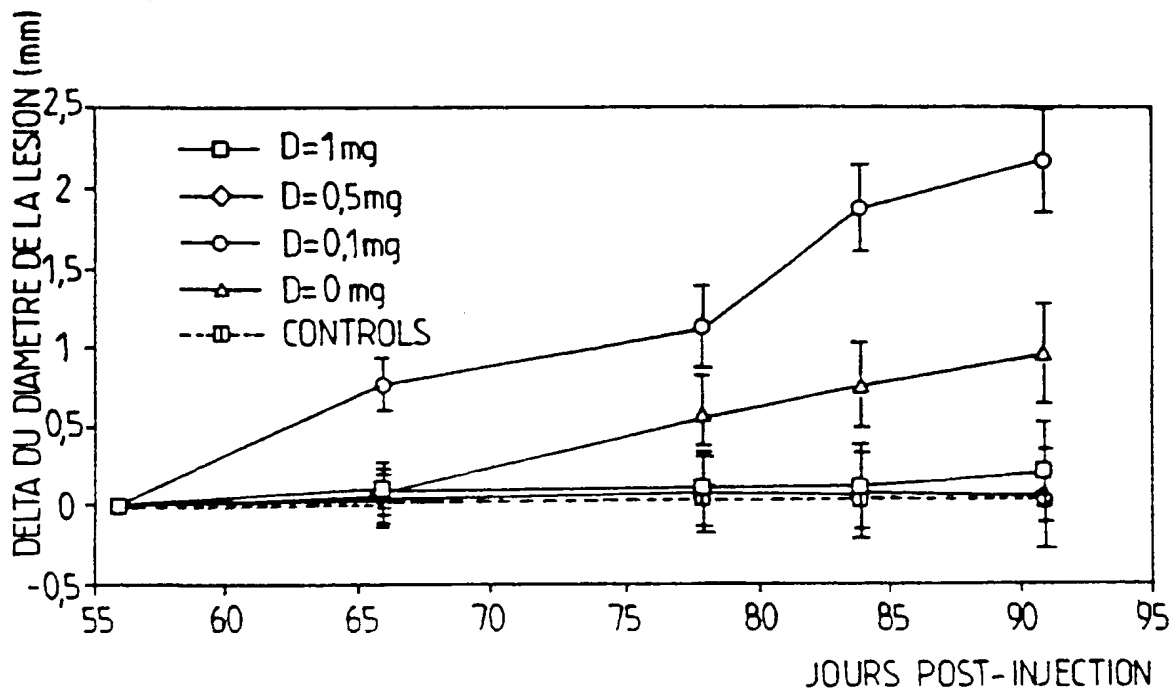


FIG.2

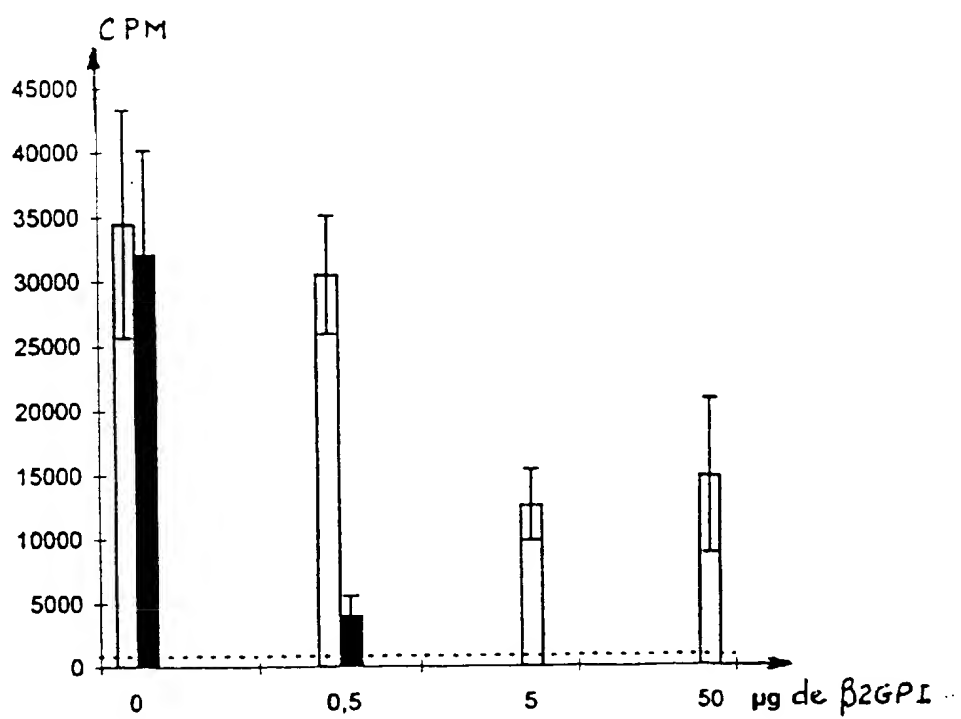


FIG.3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 95/01030A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | JOURNAL OF VIROLOGY,<br>vol. 68, no. 4, April 1994 WASHINGTON, DC,<br>US,<br>pages 2415-2424,<br>H. MEHDI ET AL. 'HEPATITIS B SURFACE<br>ANTIGEN BINDS TO APOLIPOPROTEIN H.'<br>cited in the application<br>see the whole document<br>---<br>-/-- | 1-12                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 October 1995

Date of mailing of the international search report

24. 11. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Application No  
PCT/FR 95/01030

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| A  | <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA.,<br/>vol. 87, June 1990 WASHINGTON US,<br/>pages 4120-4124,<br/>H.P. MCNEIL ET AL. 'ANTI-PHOSPHOLIPID ANTIBODIES ARE DIRECTED AGAINST A COMPLEX ANTIGEN THAT INCLUDES A LIPID-BINDING INHIBITOR OF COAGULATION: BETA 2-GLYCOPROTEIN I (APOLIPOPROTEIN H).'<br/>see page 4124, right column, line 3 - line 10</p> <p>-----</p> | 1-12                  |

1

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 De ... Internationale No  
 PCT/FR 95/01030

 A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
 CIB 6 A61K38/17

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| A           | JOURNAL OF VIROLOGY,<br>vol. 68, no. 4, Avril 1994 WASHINGTON, DC,<br>US,<br>pages 2415-2424,<br>H. MEHDI ET AL. 'HEPATITIS B SURFACE<br>ANTIGEN BINDS TO APOLIPOPROTEIN H.'<br>cité dans la demande<br>voir le document en entier<br>---<br>-/-- | 1-12                          |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

'X' document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

'Y' document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

'A' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 Octobre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24. 11. 95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der Internationale No  
PCT/FR 95/01030

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |  |                               |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
| A   | <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA.,<br/>vol. 87, Juin 1990 WASHINGTON US,<br/>pages 4120-4124,<br/>H.P. MCNEIL ET AL. 'ANTI-PHOSPHOLIPID ANTIBODIES ARE DIRECTED AGAINST A COMPLEX ANTIGEN THAT INCLUDES A LIPID-BINDING INHIBITOR OF COAGULATION: BETA 2-GLYCOPROTEIN I (APOLIPOPROTEIN H).'<br/>voir page 4124, colonne de droite, ligne 3<br/>- ligne 10</p> <p>-----</p> | 1-12                          |